

ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD  
ACCESSION NUMBER: 1987-267070 [38] WPIDS  
DOC. NO. CPI: C1987-113214  
TITLE: Stability enhanced modified interleukin-2 - comprises bound matter with amide gp. between amino gp. of interleukin-2 and carboxyl gp. of ethylene glycol.  
DERWENT CLASS: A96 B04  
PATENT ASSIGNEE(S): (AJIN) AJINOMOTO KK  
COUNTRY COUNT: 1  
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG
JP 62185029	A	19870813	(198738)*	5	<--

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
JP 62185029	A	JP 1986-25242	19860207

PRIORITY APPLN. INFO: JP 1986-25242 19860207

AN 1987-267070 [38] WPIDS

AB JP 62185029 A UPAB: 19930922

A modified interleukin-2 comprises a bound matter which keeps an interleukin-2 activity and has an amide bond between an amino gp. of interleukin-2 and a carboxyl gp. of a polyethylene glycol whose terminal hydroxymethyl gp. is oxidised to a carboxyl gp. or a bound matter in which an amino gp. of interleukin-2 is bound to a terminal reactive gp. of a polyethylene glycol whose terminal hydroxymethyl gp. is oxidised or not oxidised through a crosslinking agent. The polyethylene glycol has pref. mol.wt. of  $5 \times 10^2$  to  $4 \times 10^4$ . The coupling method is effected by converting a carboxyl gp. of the polymer to an active ester with a carboxyl gp. activating agent followed by the reaction of this ester with an amino gp. of interleukin-2. Introduction of a carboxyl gp. to polyethylene glycol is effected by oxidising a terminal hydroxyl gp. to form a carboxymethylether or the esterification with a dicarboxylic acid anhydride. The reaction is effected by dissolving interleukin-2 (concn. = 0.01-1 pref. 0.05-0.5%) in a buffer (pH = 6-10 pref. 6.5-8.5) and reacting 1 mol of interleukin-2 with 0.5-20 pref. 1-5 mol of the activated polymer.

USE/ADVANTAGE - The modified interleukin-2 enhances the stability in a human body while keeping the activity.

## ⑱ 公開特許公報 (A)

昭62-185029

⑤Int.Cl.  
A 61 K 37/04  
// C 08 G 65/32

識別記号  
N Q J

厅内整理番号  
7138-4C  
8016-4J

④公開 昭和62年(1987)8月13日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑤発明の名称 修飾インターロイキン-2

⑥特願 昭61-25242

⑦出願 昭61(1986)2月7日

⑧発明者	辻 尚志	川崎市川崎区鈴木町1-1	味の素株式会社中央研究所内
⑨発明者	松沢 淑雅	川崎市川崎区鈴木町1-1	味の素株式会社中央研究所内
⑩発明者	椎 尾 剛	川崎市川崎区鈴木町1-1	味の素株式会社中央研究所内
⑪発明者	上 村 晃	川崎市川崎区鈴木町1-1	味の素株式会社中央研究所内
⑫発明者	岩 下 雄二	川崎市川崎区鈴木町1-1	味の素株式会社中央研究所内
⑬発明者	福 原 健一	川崎市川崎区鈴木町1-1	味の素株式会社中央研究所内
⑭出願人	味の素株式会社	東京都中央区京橋1丁目5番8号	

## 明細書

## 1. 発明の名称

修飾インターロイキン-2

## 2. 特許請求の範囲

(1) インターロイキン-2活性を保持していて、インターロイキン-2のアミノ基と末端のヒドロキシメチル基がカルボキシル基に酸化されているポリエチレングリコールのカルボキシル基との間のアミド結合による結合体又はポリエチレングリコールの末端のヒドロキシルメチル基が酸化され又は酸化されていないポリエチレングリコールの末端反応基とインターロイキン-2のアミノ基が架橋剤を介して結合されている結合体である修飾インターロイキン-2。

(2) ポリエチレングリコールの分子量が $5 \times 10^2$ から $4 \times 10^4$ の範囲のものである特許請求の範囲第一項記載の修飾ヒトインターロイキン-2。

## 3. 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

この発明は、修飾インターロイキン-2(IL-2)

に関する、より詳しくは生体内にて安定性の高い修飾IL-2に関する。

## (従来の技術)

IL-2は、レクチン又は抗原で活性化されたT細胞によって生成され、リンパ球の活性を調節し、抗原特異的エフェクターTリンパ球のインビトロにおける長期培養を促進しうる可溶性蛋白質である。IL-2は又胸腺細胞の分裂を促進し、細胞毒性を有するTリンパ球を活性化することも知られている。そこで、このリンパ球調節物質は、液性及び細胞性免疫を強化し、免疫の欠如する状態を正常に戻すのに有用である。IL-2のこれらの免疫活性は、癌、細菌またはウイルス感染、自己免疫疾患、免疫不全等に対する治療に有用である。

IL-2に限らず、この種な蛋白性因子を治療の目的で用いる場合、その体内での安定性がしばしば問題となる。その主たる要因としては、

1) 体内的プロテアーゼによる分解

2) 腎臓の糸球体を介する排泄

## 3) 抗原抗体反応による異物排除

等が考えられる。宿主由来の蛋白性因子を用いる場合、抗原性は示さないので、1)及び2)が主となるが、特に2)は、蛋白性因子の分子量に依存する為に、分子量の小さいものでは、特に致命的に働く。実際に、遺伝子組み換え法によってつくられたりコンビイントヒトIL-2を人に投与した場合の血中半減期は6.9分と報告されており(M.T. *et al.* J.I. 135 2865-2875(1985))、投与後、急速に血中から消失するものと考えられる。このような場合、本来、標的部位に充分な量が存在すれば効果が期待されるようなものでも、充分な効果を発揮しないことや、効果を発揮する為に、大量の投与を必要とすることが予想される。そこで、何らかの方法で蛋白性因子の血中内の安定性を増大させることができればより有効に、その効果を発揮させたり大量投与による副作用を減少させることが可能である。

蛋白性因子の安定性を増大させる方法の1つとして、非免疫原性の水溶性高分子を蛋白性因子に

結合させる方法が知られている。この方法は、蛋白性因子の分子表面を水溶性高分子で覆うことにより、プロテアーゼによる被分解性を低下させる。蛋白性因子の分子量を増大させることにより、腎臓の糸球体からの排泄を防ぐ、または抗原性のある蛋白性因子の場合、抗原部位を覆うことにより抗原性を軽減するものである。

(発明が解決しようとする問題点)

蛋白性因子と非免疫原性水溶性高分子との結合体は、いくつかの酵素やインシュリンなどで、その有用性が証明されている(例えばF.F.Davisら特開昭50-42087)が、その際に蛋白性因子が本来の生理活性を有するように結合させることが重要な点である。蛋白性因子が、その生理活性を発現するためには、その蛋白質が本来の高次構造を保っていることに加えて、その基質やレセプターに対する結合部位が開かれていることが必要である。仮に、前者が保持されても、後者は、蛋白性因子の分子表面を覆うという修飾の目的と相反するものであり、困難が予想される。基質が

小さな酵素の場合には、比較的容易に困難を乗り越えることが可能であるが、レセプターと結合することによってその生理活性を発現する蛋白性因子の場合その生理活性を保ったままで修飾することは、かなり困難である。IL-2はT細胞上のレセプターに結合することによってその活性を発現することが知られているが、レセプター分子も高分子でありレセプターとの結合を妨げずかつ、IL-2に安定性を付与するように修飾を施すことは困難であろうと予想された。

(問題を解決する為の手段)

発明者はIL-2活性が維持され、かつ体内における安定性が増大する修飾IL-2を開発すべく観察検討した結果、インターロイキン-2活性を保持していて、インターロイキン-2のアミノ基と末端のヒドロキシメチル基がカルボキシル基に酸化されているポリエチレンクリールのカルボキシル基との間のアミド結合による結合体又はポリエチレンクリールの末端のヒドロキシルメチル基が酸化され又は酸化されていないポリエチレ

ングルコールの末端反応基とインターロイキン-2のアミノ基が架橋剤を介して結合されている結合体である修飾インターロイキン-2を見い出した。

ポリエチレンクリールは分子量が $5 \times 10^2$ から $4 \times 10^4$ の範囲のものが特に有効であることが証明された。この意味におけるポリエチレンクリールは、そのモノアルキルエーテルや、カルボキシメチルエーテル等の誘導体も含んでいる。また末端ヒドロキシルメチル基の一方又は両方がカルボニル又はカルボキシル基に酸化されたものも含まれる。

カップリング方法はヒトイインターロイキン-2の生理活性を消失させない方法を選ばねばならないが、ヒトイインターロイキン-2のアミノ基と、重合体を共有結合させる方法が有効であることが証明された。その方法の1つとしては、重合体のカルボキシル基を通常のペプチド合成におけるカルボキシル基活性化剤によって活性エステルとし、これをヒトイインターロイキン-2のアミノ基と反

応させ、アミド結合を生じさせる方法がある。この場合、重合体にカルボキシル基が存在しない場合には、あらかじめ導入することによって可能である。例えば、ポリエチレングリコールの場合、末端水酸基を酸化して、カルボキシメチルエーテルとする方法や、ジカルボン酸無水物とのエステル化反応によりカルボキシル基を導入する方法が挙げられる。

反応に際しては、pH 6～10好ましくはpH 6.5～8.5になるように調製した緩衝液にIL-2を0.01～1%好ましくは0.05～0.5%の濃度で溶解した後活性化した重合体をIL-2 1モルに対し、0.5～20倍モル、好ましくは1～5倍モルを反応せしめる。この際、IL-2の濃度と添加する重合体のモル比を変化させることにより修飾IL-2の分子量をコントロールすることが可能である。

もう1つの方法は架橋剤を介する方法であり、この場合の架橋剤としては塩化シアヌルフィ化シアヌル等があげられる。この場合の反応は、直合

体をあらかじめカップリング剤と反応させることによって得られる活性化重合体を、IL-2のアミノ基と反応させることにより目的は達成される。

この様にして製造した修飾IL-2は單一分子ではなく、重合体のIL-2 1分子あたりの結合数の異なるもの及び、重合体によって2個以上のIL-2が架橋化されたものも含まれるが必要に応じて通常の蛋白質の精製に用いられる方法によって精製して用いることが出来る。

なお、本発明の製造原料であるヒトIL-2としてはヒト細胞由来のIL-2、遺伝子工学的手法によって微生物、動物細胞から得られたヒトIL-2等、製造方法に制限はない。また、遺伝子工学的手法により一部のアミノ酸置換を行なったもの、及び、N末端側、C末端側にアミノ酸残基を付加ないし欠損したもの等、本来のヒトIL-2を基本的な分子骨格とするものも含まれる。

以下実施例により、本発明を詳細に説明する。

#### 実施例1

特開昭53-141219号明細書に記載された方

法に従って、白金パラジウム炭素触媒により両末端を酸化して得られたカルボキシル基を有するポリエチレングリコール誘導体（平均分子量3,400）3.4g（0.001モル）、N-ヒドロキシコハク酸イミド0.46g（0.004モル）を300mlのN,N-ジメチルホルムアミドに溶解した後、ジシクロヘキシルカルボジイミド0.84g（0.004モル）を添加し、室温で一夜攪拌した。

生成したジシクロヘキシル尿素を離別し、濾液にジエチルエーテル600mlを加え、生成したサクシイミジル誘導体の結晶を濾過し、エーテルで洗浄後乾燥して活性化誘導体の白色結晶3.6gを得た。

大腸菌を用いて遺伝子組み換え法により製造されたヒトIL-2（R-IL-2）のリン酸ナトリウム緩衝液（0.1μ、pH 7.2）溶液（2mg/ml）1ml（0.13μmol）に上記で得られた活性化誘導体水溶液（40mg/ml）を6.2μl（0.65μmol）加え、室温で1時間反応させた。

IL-2活性はCTLL細胞を用いた<sup>3</sup>H-チミジン

取り込み分析（ヤリスら、J.Immunol.120 2027（1978））によって測定した。その結果、反応剤のIL-2が $5 \times 10^7$ ユニット/mg蛋白質であったのに対し、反応後は、 $4 \times 10^7$ ユニット/mg蛋白質と、ほぼ保たれていた。

反応液のTSKG 3000 SW（東洋曹達製）カラムを使用したHPLCによる分子量分布、及びIL-2活性を第1図に示す。

反応液を更に、セファデックスG-75（フェルマシア社製）によるカラムクロマトグラフィーによって精製した。クロマトグラム及び各フラクションのIL-2活性を第2図に示した。3.7のピークが得られたが、このうち、ピークCは、未反応IL-2であることが判明した。他の2.7のピークについて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量、等電点結合ポリエチレングリコール数（結合PEG数）、比活性を調べた結果を第1表に記した。

第 1 表

	A	B	C(IL-2)
分子量	29,000	25,000	15,500
等電点	5.5	6.5	7.8
結合PEG数 ケ/分子	2~3	1~2	0
比活性 U/mg	$1 \times 10^7$	$4 \times 10^7$	$5 \times 10^7$

## 実施例 2

実施例 1 に記した活性化誘導体水溶液(40mg/ml) 3.1μg(0.325μmol)をR-IL-2のリン酸ナトリウム緩衝液(0.1M、pH 7.2)溶液(2mg/ml) 1ml(0.13μmol)に加え室温で1時間反応させた。活性保持率は95%であった。反応液のTSK G 3000SW(東洋曹達製)カラムを使用したHPLCによる分子量分布及び、IL-2活性を第2図に示した。

## 比較例 1

R-IL-2のN-エチルモルホリン酢酸緩衝液(0.1M、pH 8.0)溶液(2mg/ml) 0.5ml(0.065μmol)に、実施例 1 に記した活性化誘導体 2.4mg(0.65

μmol)を加え、室温下2時間反応させた。反応液のTSK-G-3000SWによる分析パターンは第4図に示した。このときのIL-2活性は、反応前の5%であった。

## 実施例 3

平均分子量14,000のポリエチレングリコール14gを1.5mlのジメチルホルムアミドに90℃で溶解し、無水コハク酸3.00gを加えて、100℃で3時間反応させた。反応液を5.0mlのジエチルエーテル中に加え、生じた沈殿を滤過・洗浄することにより、ジスクシニル化ポリエチレングリコール13.93gを得た。

これを3.0mlのジメチルホルムアミドに50℃で溶解し、30℃まで冷却してN-ヒドロキシコハク酸イミド2.86g、ジシクロヘキシルカルボジイミド5.13gを加え30℃で3時間攪拌した。沈殿を滤別し、滤液を1.50mlのジエチルエーテル中に注ぎ生じた沈殿を滤過・洗浄することにより、活性化されたポリエチレングリコール13.43gを得た。

得られた活性化ポリエチレングリコール水溶液(40mg/ml) 20μgをR-IL-2のリン酸ナトリウム緩衝液(0.1M、pH 7.2)溶液(2mg/ml) 100μgに加え、室温で1時間反応された。GPCによる分析から、72%のIL-2が修飾されており、修飾されたIL-2の比活性は $3.8 \times 10^7$ ユニット/mg蛋白質であった。

## 実施例 4

一群4匹で、且つ平均体重約303gのSD系雄性ラットから成るA、Bの2群を設け、リコンビナントIL-2蛋白(GIL-2)100μgを含み且つ12.5%のヒト血清アルブミンを併合する生食水200μlをA群の各個体の、または実施例1で得られたポリエチレングリコール修飾IL-2蛋白100μgを含み且つ0.1M-食塩を併合する0.05Mリン酸緩衝液(pH 7.0)の200μlを( IL-2蛋白換算で100μg相当分を含む)B群の各個体の、それぞれ尾静脈より注入した。IL-2及び修飾IL-2を投与してから2.0、5.0、10、20、30、40、60分経過後、各個体毎に頸静脈より約0.5ml相当を経時的に採

血し、常法にしたがって血清蛋白分を採取してからこの各血清試料中ににおけるIL-2量を市販のIL-2 RIAキットを用いて測定した。その結果GIL-2蛋白へのPEG修飾によりラット血中ににおける半減期はα相で2.4倍、β相で2.2倍相当時間、それぞれ延長されていることが判った。

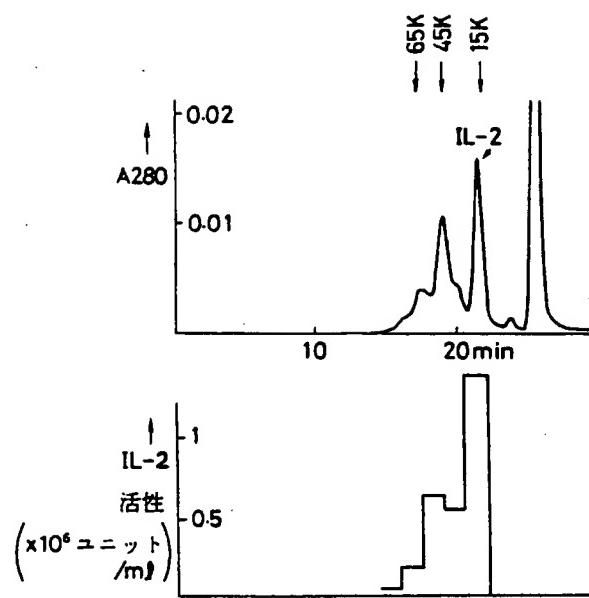
## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、修飾インターロイキン2のTSK-G 3000SWによる分析クロマトグラムである。1mlづつ分画し、そのインターロイキン-2活性を併記した。

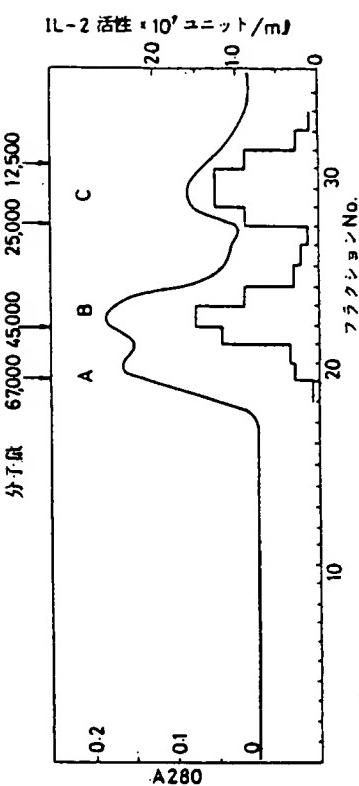
第2図は、修飾インターロイキン2のセファデックスG-75SFを用いたゲル滤過による精製時のクロマトグラムである。各フラクションのIL-2活性を併記した。

第3図及び第4図は、それぞれ修飾インターロイキン2のTSK-G 3000SWによる分析クロマトグラムである。

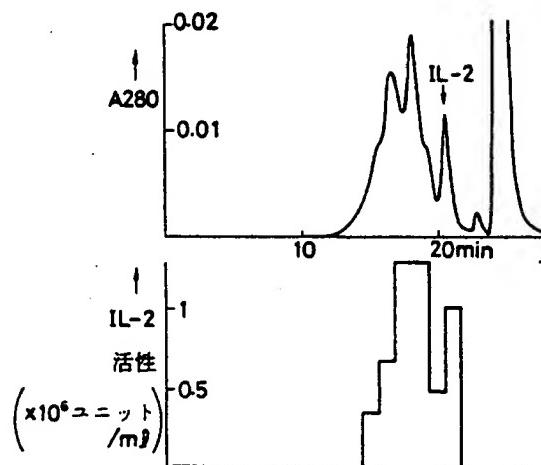
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 4 図

